昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, April 2016, 59(4): 392 - 401 doi:10.16380/j.kcxb.2016.04.004

二化螟滞育生物钟蛋白 TIME-EA4 基因的克隆及时空和温度诱导表达分析

鲁艳辉[1], 赵燕燕[1], 张发成[2], 郑许松[1], 朱平阳[2], 吕仲贤[1,*]

(1. 浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所, 杭州 310021; 2. 浙江省金华市植物保护站, 浙江金华 321017)

摘要:【目的】生物测时蛋白 TIME-EA4 是昆虫特有的一种滞育生物钟蛋白。本文旨在克隆二化螟 *Chilo suppressalis* *TIME-EA*4 基因,研究其在二化螟不同发育时期和不同组织中的时空表达模式及在不同田间种群和不同温度诱导下的滞育和非滞育种群中的表达水平。【方法】通过 RACE 技术克隆二化螟 *TIME-EA*4 基因全长 cDNA 序列,利用荧光定量 PCR 的方法检测 *TIME-EA*4 基因在二化螟不同发育时期、6 龄幼虫不同组织中的表达模式,及在不同季节采集的田间种群和不同温度处理 1 h 后的滞育和非滞育种群 6 龄幼虫中的表达量变化。【结果】从二化螟中克隆获得 *TIME-EA*4 的 cDNA 序列(GenBank 登录号: KU356855),全长 821 bp,开放阅读框 516 bp,编码 172 个氨基酸; *TIME-EA*4 基因在二化螟不同发育时期和不同组织中均有表达,且在早期蛹、雌雄成虫以及 6 龄幼虫的头部、脂肪体和中肠中表达水平较高,同时在滞育幼虫组织中的表达高于非滞育幼虫。此外, *TIME-EA*4 基因在滞育种群中的表达量是非滞育种群的 3 倍左右,同时在非滞育种群中,该基因的表达明显受 10℃及以下低温的诱导,且在 10℃时表达量最高,而在滞育种群中该基因的表达受温度影响不明显。【结论】结果说明 *TIME-EA*4 基因与二化螟的抗低温胁迫以及低温滞育相关。本研究为 TIME-EA4 在农业害虫滞育的分子作用机制研究奠定了基础。

关键词: 二化螟; 滞育; 温度诱导; 生物测时蛋白; TIME-EA4

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2016)04-392-10

Cloning and spatiotemporal and temperature-induced expression profiling of diapause bioclock protein TIME-EA4 gene in the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae)

LU Yan-Hui[1], ZHAO Yan-Yan[1], ZHANG Fa-Cheng[2], ZHENG Xu-Song[1], ZHU Ping-Yang[2], LU Zhong-Xian[1,*] (1. Institute of Plant Protection and Microbiology of Zhejiang Academy of Agricultural Science, Hangzhou 310021, China; 2. Jinhua Plant Protection Station, Jinhua, Zhejiang 321017, China)

Abstract:【Aim】Time interval measuring enzyme (TIME-EA4) is a diapause bioclock protein in insects. This study aims to clone *TIME-EA*4 cDNA and analyze its spatiotemporal expression patterns in various developmental stages and different tissues of *Chilo suppressalis*, including the populations collected in the fields, and diapause and non-diapause populations induced at various temperatures.【Methods】Full-length cDNA sequence of *TIME-EA*4 gene of *C. suppressalis* was cloned by using RACE technique. The relative expression levels of *TIME-EA*4 in different developmental stages, different tissues of the 6th instar larvae, larvae of field populations collected in different seasons and the 6th instar larvae from different populations of the moth treated for one hour at different temperatures were assayed by real-time PCR.【Results】The full-length cDNA of *C. suppressalis TIME-EA*4 is 821 bp, with an open reading

---

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303017)

作者简介: 鲁艳辉, 女, 1978 年 11 月生, 河北唐山人, 博士, 副研究员, 研究方向为昆虫生物化学与分子生物学, E-mail: luyanhui4321@126.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: luzxmh2004@aliyun.com

收稿日期 Received: 2015-12-25; 接受日期 Accepted: 2016-03-02

frame of 516 bp encoding 172 aa. *TIME-EA*4 was ubiquitously expressed, but with higher expression levels in early pupae and adults, and in the head, fat body and midgut of the 6th instar larvae. And the expression level of *TIME-EA*4 in the tissues of diapause larvae was much higher than that in the non-diapause larvae. Interestingly, the expression level of *TIME-EA*4 was significantly increased 3-fold in diapause groups compared with that in the non-diapause individuals. The abundance of *TIME-EA*4 gene was elevated at ≤10℃ in the non-diapause population, and reached the peak at 10℃. However, *TIME-EA*4 expression was not significantly altered by temperature change in the diapause population. 【Conclusion】These results suggest that the enhanced expression of *TIME-EA*4 correlates with the low temperature stress or low temperature-induced diapause in *C. suppressalis*. This study forms a basis for further investigation of TIME-EA4 in the diapause of agricultural pests.

Key words: *Chilo suppressalis*; diapause; temperature induction; bioclock protein; TIME-EA4

二化螟 *Chilo suppressalis* 俗称钻心虫,属于鳞翅目(Lepidoptera)螟蛾科(Pyralidae),是我国乃至东南亚水稻产区一种重要的蛀秆害虫。二化螟在苗期为害水稻可造成枯鞘、枯心,在孕穗期和穗期为害可造成枯孕穗、白穗和虫伤株等,严重影响水稻的质量和产量(肖海军等, 2012; 杨光平等, 2013)。二化螟属于兼性滞育昆虫,以滞育老熟幼虫在稻茎基部越冬,越冬虫表现出极强的抗寒性。二化螟的滞育是为了躲避不利的环境条件而停止生长发育的一种生理适应,从而实现生活周期与季节变化的一致性。在长江中下游地区,9 月中旬后,尚未进入预蛹的幼虫在此后不再化蛹而是滞育越冬(沈荣武和薛芳森, 1987)。进入滞育状态后,二化螟体内会相应地产生一系列的生理生化变化,包括水分、糖、蛋白质、脂肪、酶及核酸等生化物质的含量和种类都会随之改变,昆虫通过这些变化来调节滞育的维持和终止(汪信庚等, 1993; 王满囷和李周直, 2004; 强承魁等, 2012)。

生物测时蛋白是近年首先在模式昆虫家蚕 *Bombyx mori* 中发现的一种全新生物测时蛋白,是家蚕滞育卵中一种与能量利用有关的酯酶 A(esterase A4, EA4)。其具有 ATPase 瞬时活性,且具有计量低温等滞育活化因子刺激量的特性,被称为时间间隔测定酶(time interval measuring enzyme, TIME-EA4)。TIME-EA4 受活化因子刺激后改变了蛋白的空间结构,而一种结合于 TIME-EA4 的多肽类物质(peptide inhibitory needle, PIN)脱落是时间间隔测定的停止开关(Ti *et al*., 2005, 2006)。此外,目前还发现 TIME-EA4 蛋白起源于铜锌超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)家族,具有 SOD 活性并向酯酶进化,是昆虫特有的一种生物测时蛋白质(Isobe *et al*., 2006; Hiraki *et al*., 2008)。目前,关于昆虫 *TIME-EA*4 基因的研究并不多,且大多集中在家蚕上,研究低温激活 TIME-EA4 测量时间的机制有助于从生物化学角度解释家蚕卵滞育的消除以及昆虫对季节性环境的适应机制(Kai *et al*., 1995; Ti *et al*., 2004)。分子水平上的研究更为少见,孔令斐等(2010)分析了棉铃虫 *Helicoverpa armigera* *TIME-EA*4 基因的分子进化关系。Xu 等(2012)报道了不同温度和光周期对家蚕 *TIME-EA*4 基因的诱导表达。到目前为止,NCBI 数据库中报道的共有 3 种昆虫的 *TIME-EA*4 基因,包括家蚕(GenBank 登录号: DQ086424),棉铃虫(GenBank 登录号: GU143551)和野桑蚕 *Bombyx mandarina*(GenBank 登录号: DQ154907),而在其他昆虫中未见报道。

本研究克隆获得了二化螟 *TIME-EA*4 基因全长序列,分析了 *TIME-EA*4 基因的时空表达谱,并测定了低温、高温胁迫对室内饲养的非滞育种群以及田间采集的滞育种群 *TIME-EA*4 基因的诱导表达情况,为进一步从分子水平研究 TIME-EA4 与二化螟滞育的相关性以及该蛋白在二化螟抗低温胁迫方面的生理功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

二化螟室内种群(非滞育种群)于 2014 年 9 月采自浙江省杭州市萧山区义桥镇(30°04′N, 120°12′E)水稻田,采用人工饲料在人工气候室饲养,饲料配方及饲养方法参考中国水稻研究所胡阳等(2012)的方法。饲养条件:温度 27±2℃,相对湿度 70%±5%,光周期 16L:8D。田间种群分别于 2015 年 7 月 26 日(非滞育种群),2015 年 11 月 30 日(滞育种群)和 2016 年 1 月 21 日(滞育种群)采自浙江

省金华市郊(29°04′N, 119°38′E)水稻田,虫龄为5-6龄幼虫,采样方法为随机取样法。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 第一链合成

所有样本总 RNA 提取采用 Trizol 试剂(Invitrogen),具体步骤参照 Trizol 试剂说明书。取1 μL RNA 样品测定 OD_{260}/OD_{280}(Nanodrop 2000),比值在1.8~2.2之间的样品用于 cDNA 合成。

cDNA 合成:取3.0 μg 总 RNA,利用 Oligo dT 进行 cDNA 合成,操作步骤参照 Thermo Fisher 反转录试剂盒说明书。cDNA 置于-20℃保存以供 real-time PCR 用。

1.3 二化螟 *TIME-EA*4 基因的克隆

根据本课题组二化螟转录组测序数据获得的 *TIME-EA*4 基因片段序列,利用 Primer 3.0 软件设计 RACE 引物以及 real-time PCR 引物(表1)。取4龄幼虫按照上述操作步骤提取总 RNA,取1 μg RNA,按照 RACE 试剂盒(TaKaRa-Clontech)的操作说明合成5′RACE-Ready cDNA 和3′RACE-Ready cDNA。用 RACE 引物 CsF1 和 CsR1 分别与试剂盒提供的 UPM 引物进行第1轮 PCR 扩增,以 RACE 引物 CsF2 和 CsR2 分别与试剂盒提供的 NUP 引物进行第2轮扩增。两轮 PCR 扩增程序同为:95℃预变性5 min; 95℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸2 min,35个循环; 72℃延伸5 min。扩增片段与 pMD-18T 载体(TaKaRa)连接,转化,菌落 PCR 鉴定正确后进行测序(上海生工生物公司)。

表1 本研究所用引物序列表

Table 1 All the primer sequences used in the study

引物名称 Primer name	引物序列(5′-3′) Primer sequence	退火温度(℃) Annealing temperature	产物长度(bp) Product length
RACE			
CsF1	TCACGGAGACAGAAGACCAC	60	
CsR1	CGTCGAAAACAATGTTGCCC	60	
CsF2	CCGGTGTAGTATTGGTCGGT	60	
CsR2	CCTGCCGATGATGTTGTGAG	60	
实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)			
CsRT-F	AGCTCACAACATCATCGGCA	60	105
CsRT-R	CGACCTCCTGCATTTCCAGT	60	
CsNG-F	AAATCACGTCTGGCAACCCT	60	125
CsNG-R	TTAGCCGCTTTCTTGACGGT	60	

1.4 *TIME-EA*4 基因 mRNA 的时空表达谱分析

不同发育阶段样本:利用室内非滞育种群,收集不同发育阶段的样本,包括:第5天的卵,1-6龄幼虫(蜕皮后第1天的幼虫,饥饿3 h),早期蛹(第1天的蛹),晚期蛹(第7天的蛹),雌雄成虫(第1天羽化的成虫)。

不同组织样本:分别从室内非滞育种群和2016年1月21日采集的田间滞育种群中选择个体大小一致健康的6龄幼虫,饥饿处理3 h,在预冷的生理盐水中解剖,获取头、中肠、脂肪体和表皮4部分组织,每个重复10头,共3个生物学重复。

将所有样本按照1.2节所述提取总 RNA,反转录合成 cDNA,以 β-tubulin 基因(GenBank 登录号:EU429675)为内参基因,对 *TIME-EA*4 基因 mRNA 表达量进行 real-time PCR 检测。反应体系20 μL:SYBR(Bio-Rad)10 μL,上下游引物各1 μL(表1),cDNA 模板1 μL,ddH_2O 7 μL。反应条件:95℃预变性10 s; 95℃变性5 s,60℃退火延伸30 s,40个循环,制作融解曲线,确定扩增产物的特异性。每个样品2个技术重复。

1.5 室内及田间种群 *TIME-EA*4 基因 mRNA 的表达量检测

分别选取室内非滞育种群及3个田间种群(分别于2015年7月26日、2015年11月30日和2016年1月21日采集)中的老熟幼虫,饥饿处理3 h后,液氮速冻,置于-80℃超低温冰箱保存,以备提取 RNA 用,每个种群3个生物学重复,每个重复收集3头幼虫。所有样品按照1.2节所述提取总 RNA,反转录合成 cDNA,按1.4节进行 mRNA 表达量分析。

1.6 不同温度胁迫下 *TIME-EA*4 基因 mRNA 的表达量检测

从室内非滞育种群和2016年1月21日采集的田间滞育种群中选取大小一致的6龄老熟幼虫,饥饿3 h后,再分别采用0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40和45℃各处理1 h,收集样品,液氮速冻,置于-80℃超低温冰箱保存,以备提取 RNA 用,每个

处理 3 个生物学重复,每个重复收集 3 头幼虫。将所有样品按照 1.2 节所述提取总 RNA,反转录合成 cDNA,按 1.4 节进行 mRNA 表达量分析。

1.7　序列及数据分析

测序结果采用 DNAMAN 软件进行拼接,获得 *TIME-EA*4 基因的全长 cDNA 序列。序列同源性比对采用 ClustalW 软件(http://www.genome.jp/tools/clustalw/)。利用 Mega 5.1 软件建立系统发育树。Real-time PCR 数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法处理,差异显著性采用 DPS 软件分析($P \leqslant 0.05$)。

2　结果

2.1　二化螟 *TIME-EA*4 基因全长 cDNA 序列的克隆

克隆获得二化螟 *TIME-EA*4 基因的全长 cDNA 序列(GenBank 登录号: KU356855)821 bp,其中开放阅读框(ORF)516 bp,编码 172 个氨基酸,预测蛋白的分子量 18.11 kD,等电点为 6.20。预测到 2 个 Cu/Zn-SOD 的保守结构域 GFHVHEKGDLS 和 GNAGGRVACGVI;2 个酰基化位点 GNAGGR 和 GGRVAC;1 个糖基化位点 NIT;1 个磷酸化位点 SPK(图 1)。将克隆获得的二化螟 *TIME-EA*4 基因与 NCBI 数据库(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)中注册的所有鳞翅目昆虫 *TIME-EA*4 基因的蛋白序列进行比对,发现其与棉铃虫 *H. armigera*、家蚕 *B. mori* 和野桑蚕 *B. mandarina* 的 *TIME-EA*4 基因蛋白序列具有较高的同源性,氨基酸序列一致性分别为 40.35%, 63.16% 和 63.74%,且均具有 Cu/Zn-SOD 的保守结构域(图 2)。

2.2　二化螟 TIME-EA4 氨基酸序列的系统进化树分析

采用 Mega 5.1 软件对 NCBI 数据库中注册的部分昆虫的 TIME-EA4、羧酸酯酶(CARE)、乙酰胆碱酯酶(ACHE)、酯酶(EST)以及 Cu/Zn-SOD 的氨基酸序列构建了系统进化树,进化树显示 2 个大的分支,一支为酯酶类,包括 CARE, ACHE 和 EST,另一支为 Cu/Zn-SOD 类,包括 SOD 和 TIME-EA4(图 3)。进化树的结果显示,二化螟 TIME-EA4 与家蚕 *B. mori* 和野桑蚕 *B. mandarina* TIME-EA4 的同源性最高,氨基酸序列一致性达 63%,与茶翅蝽 *Halyomorpha halys*、油橄榄果实蝇 *Bactrocera oleae* 以及小菜蛾 *Plutella xylostella* 的 Cu/Zn-SOD 同属于一个小的分支;棉铃虫的 TIME-EA4 与其他鳞翅目昆虫 TIME-EA4 分属于不同的小分支,而是与烟粉虱 *Bemisia tabaci*,家蚕 *B. mori*,甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 以及棉铃虫 *H. armigera* 的 Cu/Zn-SOD 同属于一个小的分支。虽然所有鳞翅目昆虫的 TIME-EA4 并没有聚为同一小的分支,但是进化树分析结果仍然显示 TIME-EA4 与羧酸酯酶以及乙酰胆碱酯酶等酯酶的进化距离较远(图 3)。

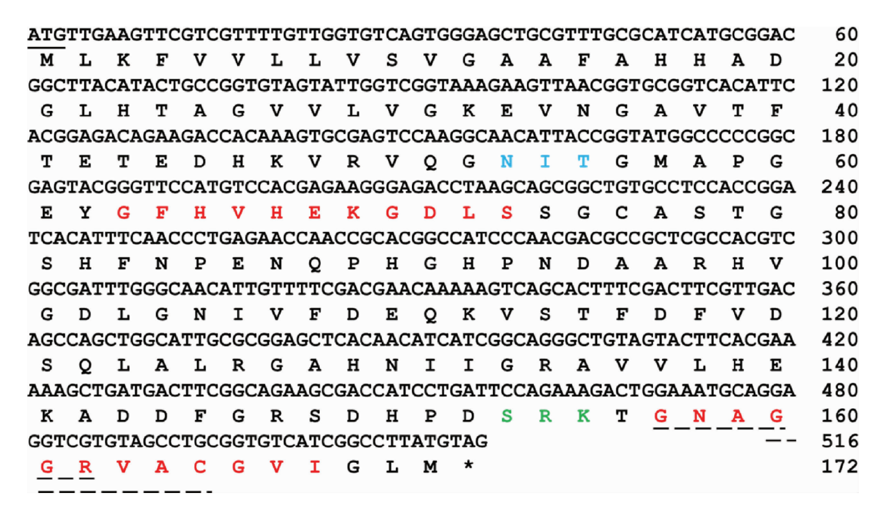


图 1　二化螟 *TIME-EA*4 基因 cDNA 全长序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1　Nucleotide and deduced amino acid sequences of *TIME-EA*4 from *Chilo suppressalis*

*TIME-EA*4 的 GenBank 登录号为 KU356855。其中黑色实线标记的 ATG 表示启动密码子,星号标记的 TAG 表示终止密码子,红色标出的氨基酸序列表示 2 个保守的 Cu/Zn-SOD 结构域,蓝色标出的氨基酸 NIT 表示糖基化位点,绿色标出的氨基酸 SPK 表示磷酸化位点,黑色虚线标出的氨基酸序列表示 2 个酰基化位点。The GenBank accession number of *TIME-EA*4 is KU356855. The start codon ATG is underlined with solid line and the stop codon TAG is marked with the asterisk. Two conserved Cu/Zn-SOD domains are indicated by red label. The NIT glycosylation sites are marked in blue and SPK phosphorylation sites are marked in green. Two acyl sites are indicated by black dotted lines.

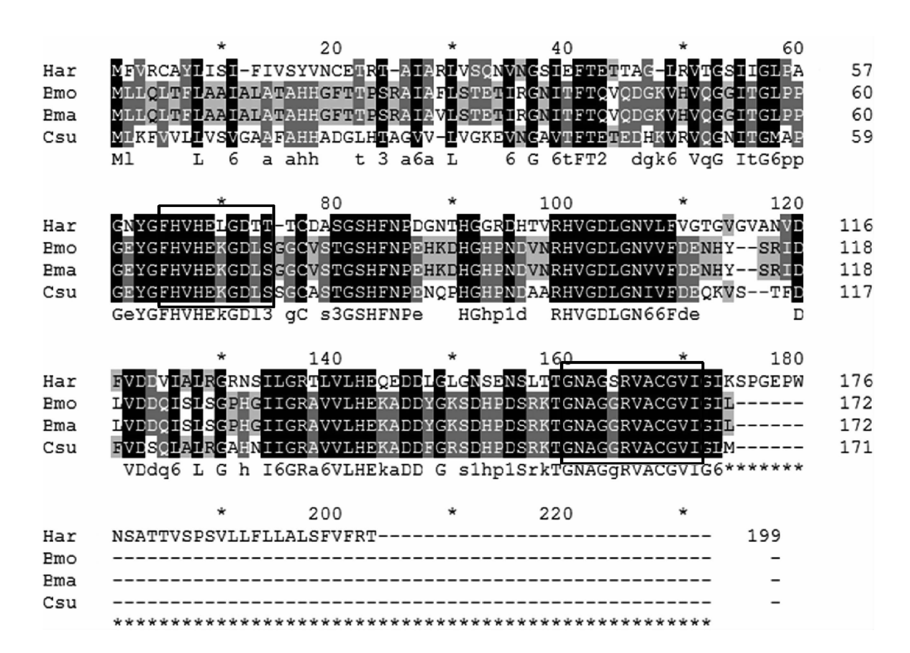


图 2 二化螟 TIME-EA4 氨基酸序列与其他鳞翅目昆虫的 TIME-EA4 氨基酸序列比对分析

Fig. 2 Alignment of amino acid sequences of TIME-EA4 from *Chilo suppressalis* and other Lepidoptera insects

蛋白基因来源及其 GenBank 登录号 Origin species of protein genes and their GenBank accession numbers: Har: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (GU143551); Bmo: 家蚕 *Bombyx mori* (EF121773); Bma: 野桑蚕 *Bombyx mandarina* (DQ154907); Csu: 二化螟 *Chilo suppressalis* (KU356855).

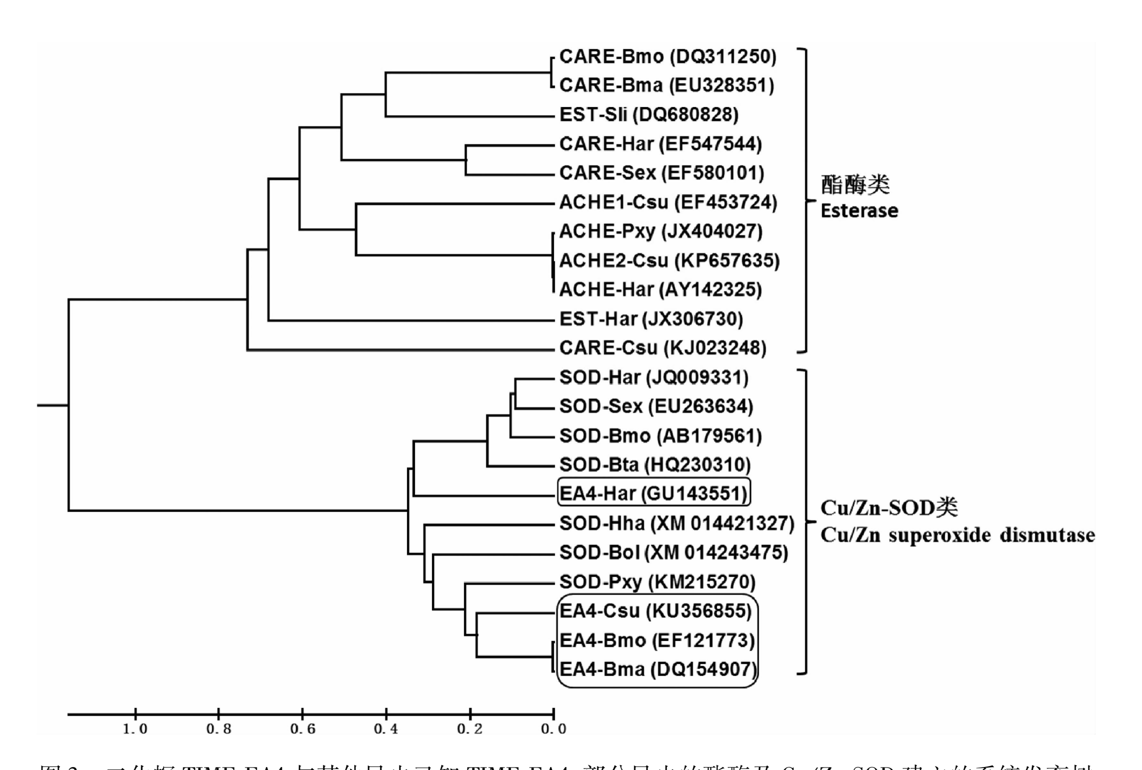


图 3 二化螟 TIME-EA4 与其他昆虫已知 TIME-EA4、部分昆虫的酯酶及 Cu/Zn-SOD 建立的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic analysis of TIME-EA4, Cu/Zn-SOD, CARE and ACHE gene sequences from *Chilo suppressalis* and other insect species

CARE: 羧酸酯酶 Carboxylesterase; ACHE: 乙酰胆碱酯酶 Acetylcholinesterase; EST: 酯酶 Esterase; EA4: 生物测时蛋白 TIME-EA4; SOD: 超氧化物歧化酶 Cu/Zn-SOD. Bmo: 家蚕 *Bombyx mori*; Bma: 野桑蚕 *Bombyx mandarina*; Sli: 灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis*; Har: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*; Sex: 甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*; Csu: 二化螟 *Chilo suppressalis*; Pxy: 小菜蛾 *Plutella xylostella*; Bta: 烟粉虱 *Bemisia tabaci*; Hha: 茶翅蝽 *Halyomorpha halys*; Bol: 油橄榄果实蝇 *Bactrocera oleae*.

2.3 *TIME-EA4* 基因在二化螟不同发育时期和不同组织的表达量

利用室内非滞育种群测定了 *TIME-EA4* 基因在二化螟不同发育时期的表达。结果表明：*TIME-EA4* 基因在二化螟不同发育时期均有表达，但是表达水平随着二化螟发育时期的变化而变化，表达量由高到低依次为：雌成虫，雄成虫，早期蛹，晚期蛹，1 龄幼虫，卵，5 龄幼虫，6 龄幼虫，4 龄幼虫，2 龄幼虫和 3 龄幼虫，且在雌成虫中的表达显著高于其他发育阶段；在雄成虫和早期蛹中的表达量无显著差异；在卵、1 龄幼虫和晚期蛹中的表达量无显著差异；在其他发育阶段表达也无显著差异，且表达量相对较低（图 4）。

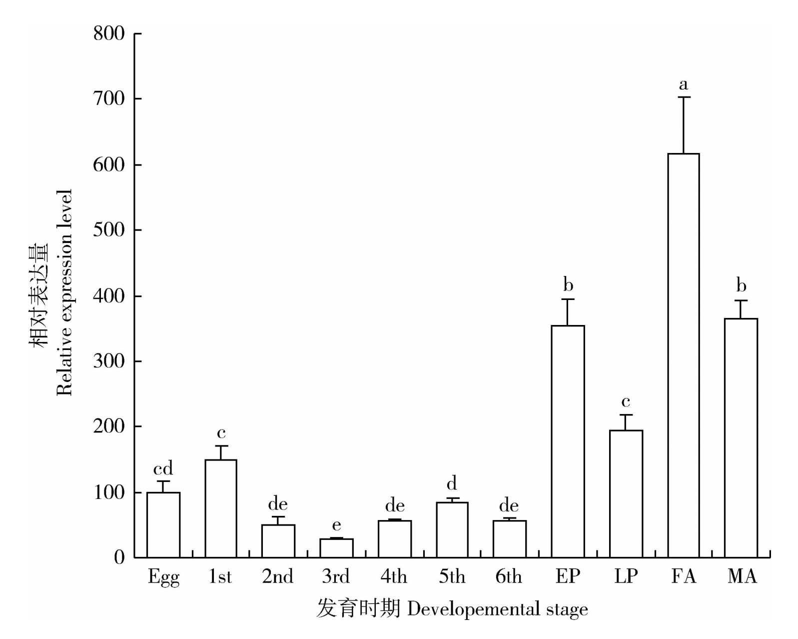


图 4　*TIME-EA4* 基因在二化螟室内非滞育种群不同发育时期的表达量

Fig. 4　Developmental stage-specific expression levels of *TIME-EA4* gene in the non-diapause population of *Chilo suppressalis*

Egg：第 5 天的卵 5-day-old egg；1st：第 1 天的 1 龄幼虫 1-day-old 1st instar larva；2nd：第 1 天的 2 龄幼虫 1-day-old 2nd instar larva；3rd：第 1 天的 3 龄幼虫 1-day-old 3rd instar larva；4th：第 1 天的 4 龄幼虫 1-day-old 4th instar larva；5th：第 1 天的 5 龄幼虫 1-day-old 5th instar larva；6th：第 1 天 d 的 6 龄幼虫 1-day-old 6th instar larva；EP：第 1 天的蛹 1-day-old pupa；LP：第 7 天的蛹 7-day-old pupa；FA：第 1 天的雌成虫 1-day-old female adult；MA：第 1 天的雄成虫 1-day-old male adult. 数据处理以卵期 *TIME-EA4* 基因的表达量为基准进行计算，标准误由 3 次生物学重复计算得出，统计分析采用 DPS 的 One-Way ANOVA-Fisher's LSD 方法（$P \leq 0.05$）。All the data were calculated based on the expression level of *TIME-EA4* in the egg stage. Standard error bars were based on three replicates. One-Way ANOVA-Fisher's LSD method of DPS software was used for statistical analysis（$P \leq 0.05$）.

TIME-EA4 基因在二化螟室内非滞育和田间滞育（2016 年 1 月 21 日采集）的 6 龄幼虫所有测定的组织中均有表达（图 5）。在非滞育的幼虫中，头部中表达量最高，其次为脂肪体、中肠和表皮中。在头部中的表达量与脂肪体和中肠中的表达量无显著差异，中肠与表皮中的表达量也无显著差异；在滞育的幼虫中，同样也是头部中表达量最高，其次为中肠、脂肪体和表皮中，且在头部中的表达量显著高于其他 3 个组织。此外，滞育与非滞育幼虫同一组织中的表达量比较来看，滞育幼虫组织中的表达量高于非滞育幼虫组织中的表达量，且除中肠外，在其他测定的 3 个不同组织中，滞育幼虫与非滞育幼虫间表达量具有显著差异（图 5）。

2.4 *TIME-EA4* 基因在二化螟室内种群及田间种群中的表达量

根据上述结果可知，*TIME-EA4* 基因在二化螟不同发育时期和不同组织中均有表达，又结合二化螟是以老熟幼虫的形式滞育越冬，所以我们比较了二化螟非滞育种群（室内种群和 2015 年 7 月 26 日采集种群）和滞育种群（2015 年 11 月 30 日和 2016 年 1 月 21 日采集）6 龄幼虫中 *TIME-EA4* mRNA 的表达情况（图 6）。结果表明：*TIME-EA4* mRNA 在滞育种群中的表达量显著高于非滞育种群中的表达量，以室内种群 *TIME-EA4* mRNA 的表达量为对照比较，两个滞育种群中该基因的表达量提高了 1.5 倍左右，而非滞育的田间种群表达量与对照无显著差异（图 6）。

2.5 不同温度对二化螟室内非滞育种群和田间滞育种群 *TIME-EA4* 基因表达量的影响

由于二化螟的滞育与温度密切相关，为了明确 *TIME-EA4* 基因与二化螟滞育的关系，我们利用不同温度分别处理室内非滞育种群和田间滞育种群（2016 年

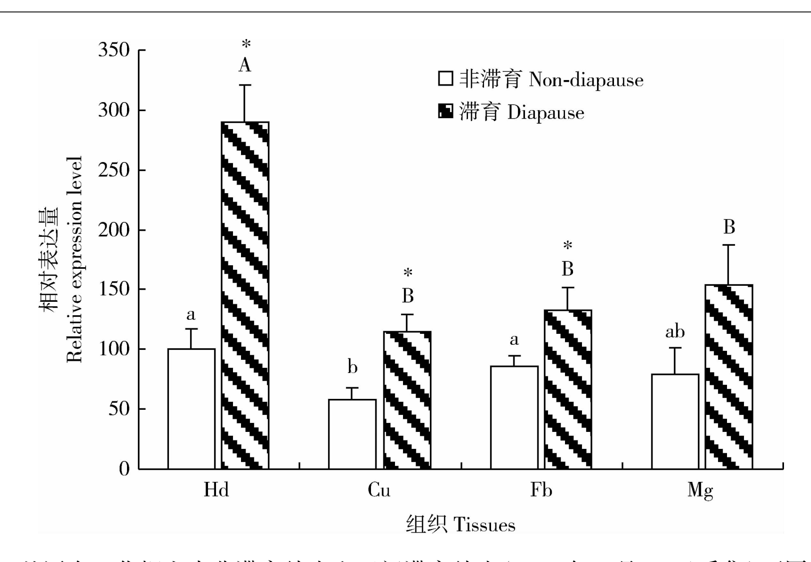


图 5 *TIME-EA*4 基因在二化螟室内非滞育幼虫和田间滞育幼虫(2016 年 1 月 21 日采集)不同组织中的表达量

Fig. 5 Tissue-specific expression levels of *TIME-EA*4 gene in the 6th instar larvae of *Chilo suppressalis* from indoor non-diapause population and field diapause population collected on January 21, 2016

Hd：头 Head；Cu：表皮 Cuticle；Fb：脂肪体 Fat body；Mg：中肠 Midgut. 数据处理以非滞育种群头部 *TIME-EA*4 基因的表达量为对照进行计算,标准误由 3 次生物学重复计算得出。不同小写字母表示室内非滞育 6 龄幼虫不同组织间 *TIME-EA*4 表达量具有显著差异(One-Way ANOVA-Fisher's LSD , $P \leqslant 0.05$),不同大写字母表示田间滞育 6 龄幼虫不同组织间 *TIME-EA*4 表达量具有显著差异(One-Way ANOVA-Fisher's LSD , $P \leqslant 0.05$),星号表示滞育与非滞育6 龄幼虫同一组织间 *TIME-EA*4 表达量具有显著差异(*T* 检测,$P \leqslant 0.05$)。All the data were calculated based on the expression level of *TIME-EA*4 in the head of the non-diapause population. Standard error bars were based on three replicates. Different lowercase and capital letters above the standard error bars indicate significant differences among the tissues of non-diapause population and among the tissues of diapause population , respectively (One-Way ANOVA-Fisher's LSD Method of DPS software, $P \leqslant 0.05$). The asterisks above the standard error bars indicate significant differences in the same tissue between diapause population and non-diapause population (*T* test, $P \leqslant 0.05$).

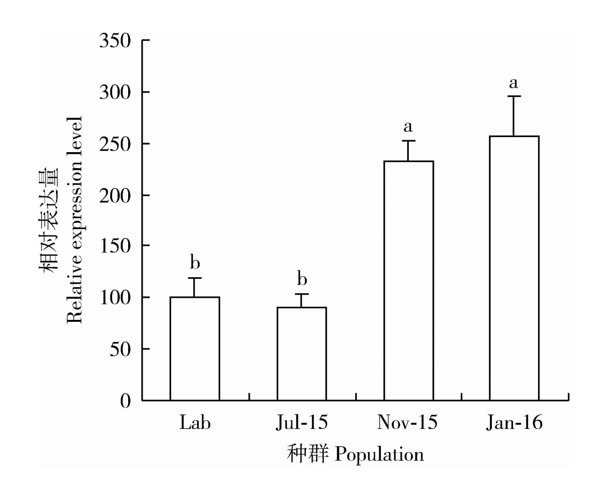


图 6 *TIME-EA*4 基因在二化螟室内种群及 3 个田间种群中的相对表达量

Fig. 6 Relative expression level of *TIME-EA*4 in the indoor population and three field populations of *Chilo suppressalis*

室内种群(Lab)和 2015 年 7 月 26 日采集的田间种群(Jul-2015)为非滞育种群,2015 年 11 月 30 日(Nov-2015)和 2016 年 1 月 21 日采集的田间种群(Jan-2016)为滞育种群。标准误由 3 次生物学重复计算得出,统计分析采用 DPS 的 One-Way ANOVA-Fisher's LSD 方法($P \leqslant 0.05$)。The indoor population (Lab) and field population collected on July 26, 2015 (Jul-2015) are non-diapause populations. And the field populations collected on November 30, 2015 (Nov-2015) and January 21, 2016 (Jan-2016) are diapause populations. Standard error bars were based on three replicates. One-Way ANOVA-Fisher's LSD method of DPS software was used for statistical analysis used ($P \leqslant 0.05$).

1 月 21 日采集)的 6 龄幼虫,测定了温度对 *TIME-EA*4 基因表达的影响(图 7)。结果表明:以室温(25℃)正常饲养的非滞育种群 *TIME-EA*4 基因表达量为对照,发现低温(0, 5 和 10℃)可以显著诱导非滞育种群二化螟 *TIME-EA*4 基因表达,且 10℃的低温诱导效果最明显,表达量上调为对照的 2.9 倍,其次为 0 和 5℃,表达量分别上调为对照的 1.8 和 1.6 倍。高温对非滞育种群 *TIME-EA*4 基因的表达没有明显诱导作用。此外,我们同样发现,除 10℃条件下,滞育种群中 *TIME-EA*4 基因表达显著均显著高于非滞育种群,但受温度影响不显著(图 7)。说明 *TIME-EA*4 基因可能在二化螟滞育或者抗低温胁迫现象中起重要作用。

3 讨论

滞育是昆虫受环境条件诱导产生的一种发育停滞状态,通常稳定发生于个体发育的特定阶段,是昆虫长期适应不良环境形成的生物学特性。昆虫进入滞育后,必须通过一定时间的滞育代谢后才能解除滞育进入发育状态,而滞育代谢的完成需要特定的环境条件或活化刺激(杨光平等, 2013)。到目前为

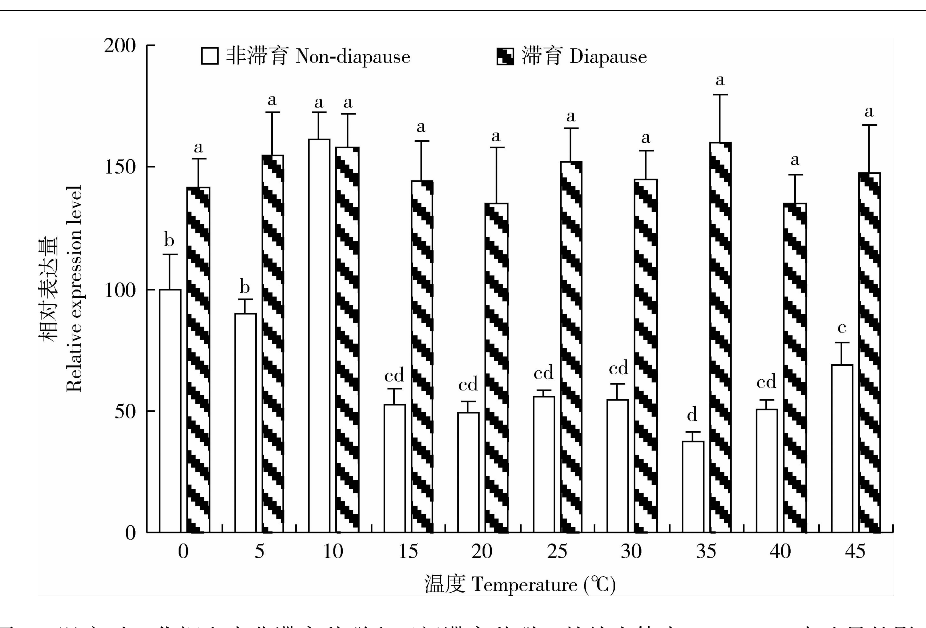


图 7 温度对二化螟室内非滞育种群和田间滞育种群 6 龄幼虫体内 *TIME-EA*4 表达量的影响

Fig. 7 Relative expression level of *TIME-EA*4 in the 6th instar larvae from the indoor non-diapause population and field diapause populations of *Chilo suppressalis* at different temperatures

田间种群采集于 2016 年 1 月 21 日。利用 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 和 45℃共 10 个不同温度进行基因的诱导表达。标准误由 3 次生物学重复计算得出,统计分析采用 DPS 的 One-Way ANOVA-Fisher's LSD 方法($P \leqslant 0.05$)。The field population was collected on January 21, 2016. The expression of *TIME-EA*4 gene was induced by 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 and 45℃. Standard error bars were based on three replicates. One-Way ANOVA-Fisher's LSD method of DPS software was used for statistical analysis ($P \leqslant 0.05$).

止,关于家蚕、二化螟等重要经济昆虫和农业害虫的滞育诱导发生和解除的生态环境条件研究已基本清楚(蒋明星等, 1999; 肖海军等, 2012),但与滞育现象相关的分子机制还不十分清楚。生物钟在生物体适应环境并维持正常生命活动中起重要作用,滞育生物测时蛋白 TIME-EA4 是昆虫特有的一种蛋白酶,被普遍认为参与了家蚕滞育卵的活化控制,具有滞育发育生物钟的作用(Kai *et al*., 1995; Ti *et al*., 2004, 2005, 2006; Pitchayawasin-Thapphasaraphong *et al*., 2009)。本研究克隆了二化螟 *TIME-EA*4 基因的全长 cDNA 序列,分析了其分子进化、不同发育时期和不同组织的时空表达谱,测定了 *TIME-EA*4 基因在 3 个不同田间种群的表达,以及温度对室内长期饲养的二化螟非滞育种群和田间滞育种群的诱导表达,为明确 TIME-EA4 在二化螟滞育中的作用机制奠定了基础。

我们克隆获得的 *TIME-EA*4 基因开放阅读框 516 bp,编码 172 个氨基酸,这与目前 NCBI 数据库中注册的家蚕和野桑蚕的 *TIME-EA*4 基因编码的氨基酸个数相同,而棉铃虫的 *TIME-EA*4 基因编码 199 个氨基酸。此外,TIME-EA4 被认为具有酯酶与 SOD 双重酶活性(Hiraki *et al*., 2008),是一种起源于 SOD 家族、正在向酯酶进化的蛋白质(Hiraki *et al*., 2008; 王玉军等, 2007; 孔令斐等, 2010)。我们的分析结果也同样表明二化螟 TIME-EA4 具有 Cu/Zn-SOD 的两个保守的特征结构域,与棉铃虫 *H. armigera*、家蚕 *B. mori* 和野桑蚕 *B. mandarina* 的 TIME-EA4 氨基酸序列的一致性分别为 40.35%, 63.16% 和 63.74%,符合功能重要的基因区域进化较慢的规律。分子进化树分析同样显示 TIME-EA4 归为 Cu/Zn-SOD 的分支,但与羧酸酯酶以及乙酰胆碱酯酶等酯酶的进化距离较远。

二化螟 *TIME-EA*4 基因的时空表达谱分析表明该基因在二化螟所有测定的发育时期和组织中均有不同程度的表达,说明该基因的表达不具备发育阶段特异性和组织特异性。丛海峰(2007)关于家蚕 *TIME-EA*4 基因的时空表达分析证明,该基因在家蚕的不同发育时期的表达量无显著差异也不具有性别特异性,而我们的研究结果表明,该基因在二化螟的不同发育阶段表达量具有显著差异,而且雌成虫的表达量远高于雄成虫,具有性别特异性。二化螟 *TIME-EA*4 基因在头部、中肠和脂肪体中的表达量较高。同样,丛海峰(2007)的研究结果表明 *TIME-EA*4 基因在家蚕中肠和脂肪体中的表达量较高,孔令斐等(2010)也证明了 *TIME-EA*4 基因在棉铃虫 *H. armigera* 中肠和脂肪体中表达量较高。众所周

知，基因表达与其功能存在一定的关系，生物测时蛋白基因 *TIME-EA*4 在不同昆虫中的表达谱大体类似，可能预示着二化螟 *TIME-EA*4 基因与家蚕类似，同样与其滞育有着某种密切关系。因此，我们又测定了滞育幼虫不同组织中的表达谱，发现在滞育幼虫头、表皮和脂肪体中，*TIME-EA*4 基因表达量显著高于非滞育幼虫中的表达量，初步证明 *TIME-EA*4 基因的高表达与二化螟的滞育有关。而二化螟 *TIME-EA*4 基因表达具有成虫性别差异性是否与其环境适应性或生殖有关，目前我们不得而知，尚需大量实验进行验证。

对于室内长期饲养的非滞育幼虫来讲，在低温环境或者低温诱导条件下，非滞育种群二化螟 *TIME-EA*4 基因呈现了表达上调的趋势，特别是在 10℃的低温诱导条件下，其表达量是常温条件下的 2.9 倍，0 和 5℃的低温诱导表达量也是常温条件下的 2 倍左右，而高温对其表达无明显的诱导作用。10℃的低温诱导条件下，该基因的表达量高于 0 和 5℃低温诱导条件下的表达量，我们推测 10℃可能是二化螟感受低温，是否进入滞育状态的一个临界点，长时间处于 10℃以下的低温，二化螟很可能进入滞育状态。目前，关于温度对该基因的诱导表达研究不多，不过有研究报道在家蚕卵的滞育过程中，随着低温时间的积累，TIME-EA4 活性迅速上升，在 2 h 内迅速达到峰值，维持滞育状态，此后随着外界条件改变，TIME-EA4 活性逐渐下降，家蚕滞育卵也随之解除滞育（丛海峰，2007）。Xu 等（2012）研究也同样证明，家蚕卵在 5℃的低温下放置 13 d，TIME-EA4 酶活性显著提高，但是并没有发现 mRNA 表达提高。不过从 mRNA 到编码合成蛋白是个复杂的过程，不可能实现完全同步也是正常现象。此外，*TIME-EA*4 基因在二化螟两个越冬田间滞育种群中的表达量远高于在生长季节田间种群以及室内种群中的表达量，这些结果都进一步证明 *TIME-EA*4 基因的高表达与二化螟的滞育或对低温逆境胁迫适应存在一定的相关性。有趣的是，虽然滞育种群中该基因的表达量显著高于非滞育种群，但是受温度影响不明显，我们推测低温诱导 *TIME-EA*4 基因表达是非滞育二化螟适应低温从而进入滞育状态并维持滞育的一个条件，而当二化螟完全进入滞育状态后，短时间的低温或高温刺激都不会影响 *TIME-EA*4 基因的表达水平。关于 TIME-EA4 作用机制也只是在家蚕中略有报道，认为在家蚕滞育卵中，PIN 与 TIME-EA4 结合，TIME-EA4 失去活性，而当滞育蚕卵感受到活化所需的低温时间后，PIN 从 TIME-EA4 脱落，TIME-EA4 获得瞬时性的活性，即：PIN 与 TIME-EA4 结合，TIME-EA4 的生物计时停止；PIN 从 TIME-EA4 脱落，TIME-EA4 生物测时启动（徐世清等，2004；丛海峰，2007）。不过这仅仅是家蚕滞育卵中 TIME-EA4 的倒计时生物钟作用机制。到目前为止，我们并不清楚该基因在二化螟或其他昆虫滞育过程中的具体作用机制。

总的来讲，目前关于生物测时蛋白 TIME-EA4 的大部分研究都集中在家蚕这种经济昆虫上，关于农业害虫 *TIME-EA*4 基因的研究很少，只发现在棉铃虫有报道，且局限于 *TIME-EA*4 基因的克隆与进化关系分析。本研究以水稻上重要害虫二化螟为对象，对其 *TIME-EA*4 基因的克隆、时空表达进行了分析；更重要的是，我们发现了 *TIME-EA*4 基因在二化螟滞育种群中表达远高于非滞育种群，且在非滞育种群中，该基因受 10℃以下的低温诱导显著，初步明确了该基因与二化螟的抗低温胁迫以及低温滞育发生的生理过程存在密切关系。我们的研究结果为 TIME-EA4 在农业害虫滞育过程中的分子机制研究奠定了基础。

参考文献（References）

Cong HF, 2007. Structure, Temporal and Spatial Expression of Gene of Diapause Bioclock Protein Esterase A4 of the Silkworm, *Bombyx mori*. MSc Thesis, Soochow University, Soochow, Jiangsu. [丛海峰，2007. 家蚕滞育生物钟蛋白质 EA4 基因的结构以及时空表达研究. 江苏苏州：苏州大学硕士学位论文]

Hiraki T, Shibayama N, Akashi SY, Park SY, 2008. Crystal structures of the clock protein EA4 from the silkworm *Bombyx mori*. *J. Mol. Biol.*, 377: 630 – 635.

Hu Y, Fu Q, Luo J, Lai FX, 2012. Artificial diet of *Chilo suppressalis* and preparation method and mass rearing method. Patent no. CN102356811A. [胡阳，傅强，罗举，赖凤香，2012. 二化螟人工饲养的饲料配方及制备方法和大规模饲养方法. 专利号 CN102356811A]

Isobe M, Kai H, Kurahashi T, Suwan S, Pitchayawasin-Thapphasaraphong S, Franz T, Tani N, Higashi K, Nishida H, 2006. The molecular mechanism of the termination of insect diapause, part 1: a timer protein, TIME-EA4, in the diapause eggs of the silkworm *Bombyx mori* is a metallo-glycoprotein. *Chembiochem.*, 7: 1590 – 1598.

Jiang MX, Xie LQ, Zhang XX, 1999. Characteristics of diapause induction of cotton bollworm. *Chin. J. Appl. Ecol.*, 10: 60 – 62. [蒋明星，谢立群，张孝羲，1999. 棉铃虫的滞育诱导特性. 应用生态学报，10: 60 – 62]

Kai H, Kotani Y, Miao Y, Azuma M, 1995. Time interval measuring enzyme for resumption of embryonic development in the silkworm,

Bombyx mori. *J. Insect Physiol*., 41：905－910.

Kong LF，Xu L，Wang WD，Sima YH，Liang H，Han HH，Chen YD，Xu SQ，2010. Cloning and molecular evolution analysis of homologous gene of biological clock protein TIME-EA4 in *Helicoverpa armigera* Hübner. *Jiangsu Agri. Sci*.，（5）：55－59.［孔令斐，徐丽，王文栋，司马杨虎，梁辉，韩慧慧，陈亚东，徐世清，2010. 棉铃虫生物钟蛋白质 TIME-EA4 同源基因克隆及分子进化分析. 江苏农业科学，（5）：55－59］

Pitchayawasin-Thapphasaraphong S，Tani N，Isobe M，Kai H，Kurahashi T，Kato J，Trisunan S，2009. Molecular heterogeneity of TIME-EA4，a timer protein in silkworm diapause eggs. *Biosci. Biotechnol. Biochem*.，73：1578－1585.

Qiang CK，Du YZ，Yu LY，Qin YH，Feng WJ，2012. Effects of temperature stress on physiological indices of *Chilo suppressalis* Walker（Lepidoptera：Pyralidae）diapause larvae. *Chin. J. Appl. Ecol*.，23：1365－1369.［强承魁，杜予州，于玲雅，秦越华，凤舞剑，2012. 温度胁迫对二化螟滞育幼虫生理指标的影响. 应用生态学报，23：1365－1369］

Shen RW，Xue FS，1987. The characteristics of diapause occurrence and its relationship with the voltinism. *Jiangxi Plant Prot*.，（2）：1－3，11.［沈荣武，薛芳森，1987. 二化螟滞育发生的特点及其与化性的关系. 江西植保，（2）：1－3，11］

Ti X，Tani N，Isobe M，Kai H，2006. Time-measurement-regulating peptide PIN may alter a timer conformation of time interval measuring enzyme（TIME）. *J. Insect Physiol*.，52：461－467.

Ti X，Tuzuki N，Tani N，Isobe M，Kai H，2005. The peptide PIN changes the timing of transitory burst activation of timer-ATPase TIME in accordance with diapause development in eggs of the silkworm，*Bombyx mori*. *J. Insect Physiol*.，51：1025－1032.

Ti X，Tuzuki N，Tani N，Morigami E，Isobe M，Kai H，2004. Demarcation of diapause development by cold and its relation to time-interval activation of TIME-ATPase in eggs of the silkworm，*Bombyx mori*. *J. Insect Physiol*.，50：1053－1064.

Wang MQ，Li ZZ，2004. The research advance of insect diapause. *J. Nanjing For. Univ*.，28：71－76.［王满囷，李周直，2004. 昆虫滞育的研究进展. 南京林业大学学报，28：71－76］

Wang XG，Cheng JA，He JH，1993. Study on diapause of the striped rice borer（*Chilo suppressalis* Walker）. *J. Zhejiang Agric. Univ*.，19：170－174.［汪信庚，程家安，何俊华，1993. 二化螟滞育的研究. 浙江农业大学学报，19：170－174］

Wang YJ，Xu SQ，Sima YH，Wu YC，Liu Y，Liu XG，Cong HF，2007. Cloning and sequence analysis of cDNA of diapause biological clock protein esterase A4 of *Bombyx mori*. *Sci. Seric*.，33：36－42.［王玉军，徐世清，司马杨虎，吴阳春，刘莹，柳学广，丛海峰，2007. 家蚕滞育生物钟蛋白质 EA4 基因的 cDNA 克隆和序列分析. 蚕业科学，33：36－42］

Xiao HJ，He HM，Xue FS，2012. Research progress in characteristics of diapause biology in *Chilo suppressalis*. *Biol. Disa. Sci*.，35：1－6.［肖海军，何海敏，薛芳森，2012. 二化螟滞育生物学特性的研究进展. 生物灾害科学，35：1－6］

Xu L，Liang H，Niu YS，Wang Y，Sima YH，Xu SQ，2012. Differential expression of the *Bombyx mori* diapause-termination timer gene EA4 in diapause-inducing temperature and photoperiod. *Arch. Insect Biochem. Physiol*.，79：182－194.

Xu SQ，Chen XL，Sima YH，2004. Research progress in diapause biological clock of *Bombyx mori*. In：Proceedings of the 2004 National Conference on Biomedical Science，Haikou. 38－44.［徐世清，陈息林，司马杨虎，2004. 家蚕的滞育生物钟研究进展. 见：2004 全国时间生物医学学术会议论文集. 海口. 38－44］

Yang GP，Liu YD，Hou ML，2013. Changes of the protein and nucleic acid contents and the activities of protective enzymes in diapausing larvae of the rice stem borer，*Chilo suppressalis*（Lepidoptera：Pyralidae）. *Acta Entomol. Sin*.，56：251－256.［杨光平，刘玉娣，侯茂林，2013. 二化螟滞育幼虫的蛋白和核酸含量以及保护酶活性的变化. 昆虫学报，56：251－256］

（责任编辑：袁德成）